

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-151699

(P2001-151699A)

(43) 公開日 平成13年6月5日(2001.6.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード*(参考)
A 6 1 K 39/39		A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
39/02		39/02	
39/245		39/245	
A 6 1 P 31/04		A 6 1 P 31/04	
31/12	1 7 1	31/12	1 7 1
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 12 頁)			

(21) 出願番号	特願平11-337421	(71) 出願人	000228729 日本サーファクタント工業株式会社 東京都板橋区蓮根3丁目24番3号
(22) 出願日	平成11年11月29日(1999. 11. 29)	(71) 出願人	591193370 株式会社微生物化学研究所 京都府宇治市槇島町二十四16番地
		(71) 出願人	000226437 日光ケミカルズ株式会社 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番8号
		(74) 代理人	100063897 弁理士 古谷 馨 (外3名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 動物用ワクチンのオイルアジュバント

(57) 【要約】

【課題】 乳化安定性が良好で、注射された動物に対してショック、発熱、接種部位の壊死、硬結、疼痛等の接種反応を生じない動物用ワクチンのオイルアジュバントを提供する。

【解決手段】 油相成分が動物油及び／又は植物油で、乳化剤として分子中にポリオキシアルキレン構造を持たない多価アルコール脂肪酸エステルを、免疫増強剤として糖又は糖アルコールの脂肪酸エステルを含有し、分子中にポリオキシアルキレン構造を持つ乳化剤を含有しない水中油型エマルジョンをオイルアジュバントとして用いる。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 油相成分が動物油及び／又は植物油であり、乳化剤として分子中にポリオキシアルキレン構造を持たない多価アルコール脂肪酸エステルを、免疫増強剤として糖又は糖アルコールの脂肪酸エステルを含有し、分子中にポリオキシアルキレン構造を持つ乳化剤を含有しない油中水型エマルジョンからなる動物用ワクチンのオイルアジュバント。

【請求項2】 多価アルコール脂肪酸エステルが、ポリグリセリン脂肪酸エステル及びショ糖脂肪酸エステルから選ばれた1種以上である請求項1記載のオイルアジュバント。

【請求項3】 乳化安定剤として、単糖類、2糖類及び糖アルコールから選ばれた1種以上を含有する請求項1又は2記載のオイルアジュバント。

【請求項4】 請求項1～3の何れか1項記載のオイルアジュバントと、少なくとも一種の抗原とを含む、動物用ワクチン。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、油中水型（以下O/W型という）のオイルアジュバント及びそれらのアジュバントを含む動物用のワクチンに関する。

##### 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来、免疫を強化するためのオイルアジュバントとして、フロイントアジュバントに代表される水中油型（以下W/O型という）アジュバントや、親水性界面活性剤を多く用いたO/W型アジュバントが主として使用されてきた。しかしこれらの内、W/O型オイルアジュバント製剤は免疫効果が高い反面、ワクチン注射部位に硬結や腫脹、疼痛、壊死などを引き起こす事例が少なからずあった。一方、O/W型オイルアジュバント製剤では接種部位の硬結、腫脹、壊死などを引き起こす例は少ないものの、乳化剤として、可溶化力が強く細胞障害性が高いポリオキシエチレン系の親水性乳化剤を含むことから、ワクチンを接種された動物に強い発熱が認められることが問題となっていた。

【0003】具体的には、（1）特公平8-32639号公報には、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンブロックポリマー及びソルビタンモノオレートとを乳化剤に使用してスクアレンを乳化した、O/W型ワクチンアジュバントが開示されている。また、（2）特開平5-255117号公報には、少なくとも1種以上の疎水性合成リポ多糖、界面活性剤及び水性溶質よりなるO/W型ワクチンアジュバントが開示されている。また、

（3）特開平6-172216号公報には、油相成分に植物油を、界面活性剤としてソルビタン脂肪酸エステルとポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとを使用したオイルアジュバントワクチンが開示されている。

更に、（4）特公平6-81731号公報には、無水マンニトール・オレイン酸エステルと流動パラフィンとからなるW/O型ワクチンアジュバントが開示されている。しかし、（1）～（3）は何れもポリオキシアルキレン構造を有する界面活性剤による効果を示すものであり、また、（4）はW/O型であり、何れも接種した動物に対して発熱、接種部位の壊死、硬結、疼痛等の接種反応を生じさせる。

【0004】また、一般にO/W型乳化アジュバントを調製する際には、乳化安定剤として、エタノール、イソプロパノール等の水溶性低級アルコール、セロソルブ類、カービトール類等の水溶性グリコールエーテル（以上、総称して、水溶性溶剤とする）、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブタンジオール、低分子ポリエチレングリコール等の水溶性多価アルコールが使用されるが、これらも、接種した動物に対して酪酐、発熱、硬結、疼痛、等の接種反応を生じさせるので好ましくないが、これらの水溶性多価アルコールを使用しないでO/W乳化を行うと、生成した乳化粒子の径が小さくならず（1000nm以上）、経時的に乳化粒子の合一を生じ、安定性が低下する。

【0005】このように、従来の動物ワクチン用オイルアジュバント製剤は、安定性の良い乳化物を得るために、生体に対して刺激が強く、接種した動物に対して接種反応を生じさせやすい成分を使用せざるを得なかった。しかし、動物保護等の観点から、このような問題が無く、且つ、経時的に安定で、免疫増強作用の良好な動物用ワクチンのオイルアジュバントが望まれている。

##### 【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、本発明は、油相成分が動物油及び／又は植物油（以下動・植物油という）であり、乳化剤として分子中にポリオキシアルキレン構造を持たない多価アルコール脂肪酸エステルを、免疫増強剤として糖又は糖アルコールの脂肪酸エステルを含有し、分子中にポリオキシアルキレン構造を持つ乳化剤を含有しない油中水型エマルジョンからなる動物用ワクチンのオイルアジュバントを提供するものである。更に本発明は、該オイルアジュバントと、少なくとも一種の抗原とを含む、動物用ワクチンを提供するものである。

【0007】本発明のオイルアジュバント及びワクチンは、ヒトを除く動物に適用されるが、具体的な対象動物としては、家畜、家禽、愛玩用動物、魚類が挙げられる。

##### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】（1）動・植物油

油相成分の動物油としては、スクアレン及びスクアラン等の炭化水素油、牛脂、馬油、ミンク油及び卵黄脂肪油等のエステル油等が挙げられる。これらの中で、特に、

スクワレン、スクワランが、好適である。スクワレンは、深海サメの肝油中に存在する炭化水素油であり、スクワランとはスクアレンの水素添加物である。これらは動物由来であるので、生体適合性及び安全性の面で、特に好ましい。又、スクアランは、不飽和油であるスクアレンの水素添加物であるので、酸化安定性に優れる。

【0009】また油相成分の植物油としては、アボガド油、オリーブ油、ゴマ油、コメヌカ油、トウモロコシ胚芽油、小麦胚芽油、サフラワー油、ダイズ油、トウモロコシ油、ナタネ油、パーム油、ククイナッツ油、マカデミアナッツ油、月見草油等のトリグリセライド、ホホバ油等のロウエステルが挙げられる。同様に、オリーブオイルの不ケン化物中に存在する炭化水素油である、植物起源のオリーブスクワレン及びオリーブスクワランも、好適に使用できる。

【0010】さらには、上記した動・植物油のうちエステル油を、低級アルコール又は高級アルコールとエステル交換を行い、アルコール脂肪酸エステルとした油も好適に使用できる。具体的には、オレイン酸エチル、オレイン酸オレイルなどのアルコール脂肪酸エステル等が挙げられる。

【0011】これらの動・植物油のうち構造中に不飽和結合を多く含むもの、具体的には、動物油では、スクワレン、卵黄脂肪油等、植物油では、オリーブスクワレン、ククイナッツ油、マカデミアナッツ油、月見草油、ローズヒップ油等は、酸化に対して不安定であるので、抗酸化剤を添加することで、本発明に、好適に使用できる。好ましい抗酸化剤としては、ビタミンE類、ビタミンA類、ブチルヒドロキシアニソール、p-ヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン、没食子酸ブロピル、パルミチン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル等の油溶性抗酸化剤、アスコルビン酸、カテキン類、エリソルビン酸、エリソルビン酸ナトリウム等の水溶性抗酸化剤が挙げられる。これらの抗酸化剤は、オイルアジュバント調製において、油相成分と混合して、あるいは、使用する水に予め溶解しておいて、使用することができる。

【0012】本発明のO/W型オイルアジュバント中の好ましい動・植物油の配合量は、アジュバント製剤全体に対して重量比で、好ましくは10～80%、より好ましくは20～80%、特に好ましくは20～50%である。この範囲において、アジュバント効果の持続性やエマルジョンの安定性が良好となる。

#### 【0013】(2) 乳化剤

本発明のオイルアジュバントでは、乳化剤として分子中に、ポリオキシエチレン（以下POEという）構造、ポリオキシプロピレン（以下POPという）構造等のポリオキシアルキレン構造を持たない多価アルコール脂肪酸エステルが使用される。かかる多価アルコール脂肪酸エステルは、多価アルコールと脂肪酸を、カセイソーダ等

のアルカリ触媒下、又は、パラトルエンスルホン酸等の酸性触媒下、200～250℃で、公知の方法で脱水縮合して製造されたエステルである。エステル反応後、ろ過等の精製工程を経て触媒等を除去し、本発明に供せられる。好ましい多価アルコールとしては、ソルビタン、ソルビトール、イソソルバイト等のソルビトール類及び分子内脱水物、グリセリン、ジグリセリン、テトラグリセリン、ヘキサグリセリン、ペンタグリセリン、デカグリセリン等のグリセリン及びポリグリセリン類、ペンタエリスリトール、ショ糖、アルキルグルコシド及びポリアルキルグルコシド類等が挙げられる。好ましい脂肪酸類としては、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸等の飽和脂肪酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸等の不飽和脂肪酸、1,2-ヒドロキシステアリン酸、リシノレイン酸等の水酸基を含む脂肪酸及びそれらの脱水縮合物等が挙げられる。

【0014】乳化剤としての多価アルコール脂肪酸エステルの好ましい極性は、HLBで9.0～18.0、好ましくは、9.0～16.0、より好ましくは、10.0～16.0の範囲である。HLBが9.0未満であると、乳化剤の親水性が小さすぎて、O/W型の乳化製剤を調製できない。HLBが18.0を超えると、乳化剤の親水性が高すぎ、油/水の界面に乳化剤が集合することなく、単独で水に分散してしまい、好ましい乳化性能を発揮せず、結果的に、O/W型の乳化製剤を調製できない。

【0015】乳化剤として特に好ましい多価アルコール脂肪酸エステルとしては、ジグリセリン、テトラグリセリン、ヘキサグリセリン、ペンタグリセリン、デカグリセリン等のポリグリセリン類と上記の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、水酸基を含む脂肪酸及びそれらの脱水縮合物とのエステル（以下、ポリグリセリン脂肪酸エステル）、及び、ショ糖と上記脂肪酸とのエステル（以下、ショ糖脂肪酸エステル）である。これらは、上記の好ましいHLBの範囲に調整され、本発明に供せられる。また、これらポリグリセリン脂肪酸エステルとショ糖脂肪酸エステルは、それぞれ単独で又は混合して使用される。両者の混合比は、特に制限がない。

【0016】本発明の乳化剤の添加量は、動・植物油に対して重量比で、好ましくは1.0～50.0%、より好ましくは1.0～30.0%、特に好ましくは5.0～30.0%である。この範囲内において、良好な乳化安定性が得られる。

#### 【0017】(3) 免疫増強剤

本発明では、免疫増強剤として糖又は糖アルコールの脂肪酸エステルが用いられる。糖及び糖アルコールの脂肪酸エステルとしては、グルコース、マンノース、ラクトース、フルクトース等の単糖類及びマンニトール、ソルビトール、キシリトール等の糖アルコール類（それらの

分子内脱水物を含む)と、脂肪酸とのエステルが挙げられる。好ましい脂肪酸としては、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸等の飽和脂肪酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸等の不飽和脂肪酸、12-ヒドロキシステアリン酸、リシノレイン酸等の水酸基を含む脂肪酸及びそれらの脱水縮合物等が挙げられる。

【0018】免疫増強剤として用いられる糖及び糖アルコールの脂肪酸エステルは、HLBが9以下、特に8~1のものが好ましい。

【0019】これら免疫増強剤の配合量は、動・植物油に対して重量比で、好ましくは0.5~20%、より好ましくは、1.0~20.0%、特に好ましくは、1.0~10.0%である。この範囲において良好な免疫賦活性能が得られ、また乳化状態も良好となる。また、免疫増強剤はこの範囲内で、全O/W型オイルアジュバント中に1~5w/v%となるように配合するのが好ましい。

#### 【0020】(4) 乳化安定剤

本発明のO/W型オイルアジュバントには、その乳化安定性を向上させる目的で、更に単糖類、2糖類及び糖アルコールから選ばれる1種以上を、乳化安定剤として配合できる。

【0021】これらは、O/W型オイルアジュバントを調製する際に、乳化安定剤として一般的に使用される水溶性多価アルコールに替えて配合されるものであり、これら単糖類、2糖類、糖アルコール類は、接種した動物に対して酩酊、発熱、接種部位の壊死、硬結、疼痛等の接種反応を生じさせることがなく、O/W型オイルアジュバントの乳化粒子径を好ましい範囲(後に記述)に調整することで、安定なO/W型オイルアジュバントが調製できる。

【0022】好ましい単糖類としては、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトース、ノノース、デコースのうち、いずれも好適に使用できる。具体的には、D-キシロース、D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース等が挙げられる。好ましい2糖類としては、ショ糖、ラクトース、マルトース、トレハロース等が挙げられる。好ましい糖アルコールとしては、アルドース又はケトースのカルボニル基を還元して得られる鎖状の多価アルコールと、環状アルコールであるイノシトールが挙げられる。具体的には、ソルビトール、ソルビタン、イソソルバイト、マンニトール、キシリトール、イノシトール等が挙げられる。

【0023】これらの乳化安定剤の配合量は、本発明のO/W型オイルアジュバント中に、少なくとも5.0%、更に5.0~50%、特に10.0~50.0%(重量基準)であるのが好ましい。この範囲であると、

好ましい安定化効果を発揮でき、オイルアジュバントの粘度も適正となり、注射等の際に、作業性も良好となる。

【0024】本発明のO/W型オイルアジュバントは、公知の乳化方法、乳化機械で調製できる。好ましい方法は、動・植物油、免疫増強剤及び乳化剤の3成分、あるいはこれらと更に必要に応じて配合される乳化安定剤の4成分を、予め、室温で混合しておき、この混合物を、水相へ、ホモキサー又はパドルミキサー等で撹拌しながら、徐々に添加することで調製できる。又、上記混合物と水を同時に仕込み、撹拌・混合しても調製できる。乳化安定剤は、予め、水相へ溶解しておいても良い。その際の温度は、室温~80℃、好ましくは、室温~50℃である。又、動・植物油、免疫増強剤、乳化剤を同時に水相へ添加し、超音波乳化機等の大きい機械力を利用して調製してもよい。調製した乳化物の安定性を更に向上させる目的で、乳化後、高圧ホモジナイザーで処理することもできる。

【0025】本発明のO/W型オイルアジュバントは、乳化粒子径が、1000nm以下、好ましくは、700nm以下、より好ましくは、500nm以下である。この範囲において乳化状態の経時安定性が良好で、特に、抗原(ワクチン原体)と混合した際、乳化破壊の抑制に優れる。

【0026】本発明のO/W型オイルアジュバントに抗原(ワクチン原体)を配合する場合、好ましい配合量は50~80v/v%である。好ましい抗原(ワクチン原体)は、ウイルス粒子、細菌可溶性抗原、可溶性蛋白質、蛋白質可溶性抗原などの粒子径の小さい、好ましくは平均粒子径200nm以下の抗原である。

【0027】本発明のO/W型オイルアジュバントと抗原(ワクチン原体)は、次の方法で混合され、ワクチン製剤を得ることができる。例えば、油相成分50v/v%を含むアジュバント乳剤を使用する場合は、無菌的に調製された本アジュバント乳剤とワクチン原液を等量混合することにより、25%の油相成分を含有するO/W型アジュバントワクチンを簡単に製造できる。

【0028】本発明により得られたワクチン製剤は、27ゲージの注射針でも注射可能であり、皮下、皮内、筋肉内はもとより、アジュバントの安全性が高いため、使用する油相成分、抗原の組み合わせを選ぶことで静脈内注射によっても動物に接種することができる。

#### 【0029】

【発明の効果】本発明によれば、免疫強化性に優れ、乳化安定性が良好でかつ動物に注射するのに十分低粘度であり、しかも、接種した動物に対して接種時のショック症状、発熱、接種部位の壊死、硬結、疼痛等の接種反応が生じない動物用ワクチンのオイルアジュバント及び動物用ワクチンが得られる。

#### 【0030】

【実施例】実施例1 O/W型オイルアジュバントの調製

容量2リッターのガラス製真空乳化機（ホモミキサー及びパドル式攪拌装置、温度計、温度調節器、真空ポンプ、滴下装置が付属した）に、表1、2の処方に示す組成比で、全量が1kgになるように原料を仕込み、50ミリHgの減圧下、50℃、8000回転/分で30分間攪拌を行い、それぞれの乳化物（O/W型オイルアジュバント）を得た。

【0031】得られたO/W型オイルアジュバントの安定性は、50℃±0.2℃の恒温槽中に、1ヶ月間保管して、外観を観察し、下記の基準で評価した。

○：水相の分離が確認されず、均一

△：水相の分離容積が、全体の10%未満

×：水相の分離容積が、全体の10%以上

【0032】

【表1】

		本発明品			
		処方1	処方2	処方3	処方4
配合成分（重量%）	スクラン	50.0	25.0	10.0	10.0
	スクレン		25.0		
	卵黄脂肪油			10.0	
	オリーブ油			30.0	10.0
	ダイズ油				10.0
	ホホバ油				10.0
	オレイン酸オレイル				10.0
	dl- $\alpha$ -トコフェロール	0.02	0.02	0.02	0.02
	マンニトールオレート（免疫増強剤）	2.5	2.5	2.5	2.5
	ソルビタンモノラウレート	1.0		0.5	
	グリセリンモノステアレート		1.0	0.5	1.0
	ヘキサグリセリンモノラウレート	2.0		2.0	
	デカグリセリンモノラウレート	2.0	2.0		
	デカグリセリンモノミリステート				2.0
	ショ糖モノラウリン酸エステル		2.0	2.0	1.0
	ショ糖モノステアリン酸エステル				1.0
	グルコース（乳化安定剤）	20.0		10.0	
	ショ糖（乳化安定剤）		20.0		10.0
	ソルビトール（乳化安定剤）			10.0	
	キシリトール（乳化安定剤）				10.0
	精製水	22.48	22.48	22.48	22.48
	合計	100.0	100.0	100.0	100.0
	安定性	○	○	○	○

【0033】

【表2】

		比較品			
		処方5	処方6	処方7	処方8
配合成分 (重量%)	スクワラン	50.0	25.0	20.0	50.0
	オリーブ油		25.0	20.0	
	オレイン酸オレイル			10.0	
	dl- $\alpha$ -トコフェロール	0.02	0.02	0.02	0.02
	マンニトールオレート(免疫増強剤)	2.5	2.5	2.5	2.5
	ソルビタンモノステアレート	1.0			
	グリセリンモノステアレート		1.0		1.0
	POE(20)ソルビタンモノラウレート	4.0			4.0
	POE(15)グリセリンモノオレート		3.0		
	POE(20)セチルエーテル		1.0	2.0	
	POE(20)POP(4)セチルエーテル			3.0	
	プロピレングリコール(乳化安定剤)			20.0	
	グリセリン(乳化安定剤)				20.0
	精製水	42.48	42.48	22.48	22.48
	合計	100.0	100.0	100.0	100.0
安定性		○～△	○～△	○	○

#### 【0034】実施例2（猫免疫試験）

実施例1で調製されたO/W型オイルアジュバントの効果と安全性を確認する目的で、アジュバントなしでは通常殆ど抗体価が上昇しない猫ヘルペスウイルスを抗原として、猫を免疫し、中和抗体の測定を行うとともに、注射後の発熱と注射部位の剖検を行った。

【0035】ウイルス原液（ $10^{8.2}$ PFU/mL）を、実施例1記載の各処方方で調製したアジュバントと等量混合して試作ワクチンを調製した。3ヶ月齢の猫の頸部皮下にこれらの試作ワクチンを3週間間隔で2回1mL宛注射し、ウイルスに対する中和抗体の推移を測定すると

ともに、継時的に剖検してワクチン注射部位の組織反応を確認した。

#### 【0036】（1）中和抗体価の推移

表3に中和抗体価の推移を示すが、中和抗体価は処方1で最も高く、処方2、3、4でもほぼ同様な価が得られた。一方比較例では処方8で良好な抗体上昇が確認されたが、処方5～7では乳剤の安定性が悪く、且つ抗体上昇も不良であった。

#### 【0037】

#### 【表3】

		中和抗体価					
		初回注射後の日数(週)					
		0	3	4	6	10	15
本 発 明 品	処方1	<4	<4	63	380	450	452
		<4	<4	57	650	720	730
		<4	<4	38	480	532	618
	処方2	<4	<4	43	280	384	350
		<4	<4	34	322	410	420
		<4	<4	29	419	437	412
	処方3	<4	<4	21	450	359	343
		<4	<4	15	321	331	286
		<4	<4	23	346	298	256
	処方4	<4	<4	19	312	352	280
		<4	<4	23	401	423	360
		<4	<4	11	287	312	351
比 較 品	処方5	<4	<4	14	45	76	49
		<4	<4	26	23	18	12
		<4	<4	16	32	45	32
	処方6	<4	<4	34	226	112	65
		<4	<4	26	173	56	43
		<4	<4	12	159	38	28
	処方7	<4	<4	4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4	<4
	処方8	<4	<4	112	234	386	423
		<4	<4	143	328	437	534
		<4	<4	125	238	451	618
ア ジ ュ バ ン ト な し		<4	<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4	<4
		<4	<4	<4	<4	<4	<4

#### 【0038】(2) 発熱性に関する試験

図1は各種アジュバントで調製した試作ワクチンを注射した猫の発熱の状況を示したものである。ポリオキシエチレン系の親水性界面活性剤を全く使用していない処方1～4では発熱は軽微あるいは全く認められない〔図1(A)〕のに対して、ポリオキシエチレン系界面活性剤を含む処方5～8では注射後数時間から、3、4日にかけて強い発熱が連続し、臨床的にも重篤な症状を示す例がみられた〔図1(B)〕。

#### 【0039】(3) ワクチン注射時の猫の反応

ポリオキシエチレン系界面活性剤を含まない処方1～4ではワクチン注射時に疼痛を訴える個体はなかった。一方ポリオキシエチレン系界面活性剤を含有する処方5から8では全ての猫が、注射時に跳ねる、嘔みつく、引っ掻くなどの疼痛を訴える行動を示した。また、処方8ではワクチン注射直後に猫が酩酊状態を示す場合がみられ、後に、処方8に乳化安定剤として含有されるグリセリンの影響によるものであることが確認された。しかし

糖類を安定剤とした場合にはこのような酩酊反応は全くみられず、安全性が高いことが確認された。

#### 【0040】(4) 注射部位の接種局所反応に関する試験

表4はワクチン注射部位の剖検所見を比較した結果である。処方1から4では注射後短時間での膠様浸潤が認められるがその程度は軽く、7日後の剖検では処方1、2でわずかにみられるのみで、一ヶ月後においては注射部位には殆ど痕跡を認めず、接種反応は極めて軽いことが確認された。これに対して、処方5～8では全般に接種反応が強く、特にポリオキシエチレン系界面活性剤を含む処方5～7で強度の膠様浸潤と出血が認められた。また7日後においてもこの傾向は続き、膠様浸潤、出血はやや収まる方向にあるが接種部位の筋肉を中心として細胞浸潤による白色化がみられ、接種反応の強いことが確認された。

#### 【0041】

〔表4〕

		症状又は解剖所見			
		注射直後 ～数分後	注射 2時間後	注射 7日後	注射 1ヶ月後
本 発 明	処方1	疼痛－ 酩酊－	膠様浸潤＋ 出血＋	膠様浸潤＋ 出血±	痕跡程度
	処方2	疼痛－ 酩酊－	膠様浸潤＋	膠様浸潤＋ 出血－	痕跡なし
	処方3	疼痛－ 酩酊－	膠様浸潤＋ 出血±	膠様浸潤－ 出血－	痕跡なし
	処方4	疼痛－ 酩酊－	膠様浸潤＋	膠様浸潤－ 出血－	痕跡なし
比 較 品	処方5	疼痛+++ 酩酊－	出血+++	膠様浸潤＋ 出血++ 筋肉白色化++	皮下織肥厚 ++++ 出血++ 筋肉白色化++
	処方6	疼痛+++ 酩酊－	膠様浸潤+++ 出血++	膠様浸潤＋ 出血++ 筋肉白色化++	皮下織肥厚 +++ 出血++ 筋肉白色化++
	処方7	疼痛+++ 酩酊+++	膠様浸潤+++ 出血+++	膠様浸潤＋ 出血++ 筋肉白色化++	皮下織肥厚 +++ 出血+ 筋肉白色化++
	処方8	疼痛+++ 酩酊+++	膠様浸潤＋ 出血+	膠様浸潤＋ 出血－ 筋肉白色化－	皮下織肥厚 + 出血－ 筋肉白色化－
アジュバント なし		疼痛－ 酩酊－	膠様浸潤＋ 出血+	痕跡程度	痕跡なし

【0042】上記の事例より、一般にO/W型乳剤を調製する際に最も良く用いられているポリオキシエチレン系界面活性剤は、アジュバント製剤に用いた場合、その組織障害性により強い発熱と接種部位の障害をもたらすことから、O/W型オイルアジュバントを調製する際には、ポリオキシエチレン系界面活性剤を使用せずに安定な乳剤を得ることが重要であることが確認された。また、O/W乳剤の乳化安定剤として知られているプロピレングリコール、グリセリンは猫などに一時的な酩酊状態を誘発する事から、動物用オイルアジュバント製剤の乳化安定剤としてはグルコースなどの糖類が適用できることが確認された。このことから、本発明は安全な動物用オイルアジュバントを作成する上で欠くべからざる技

術を提供するものである。

#### 【0043】実施例3（豚免疫試験）

上記実施例で得られた知見を元に、豚用ワクチンに適合するオイルアジュバント処方確立すべく、下記表5の処方にて調製されたO/W型オイルアジュバントの効果と安全性を確認する目的で、豚丹毒及びアクチノバシラス・ブルロニューモニエ1型、2型、及び5型を抗原とした混合ワクチンをマウス、モルモット、及び豚に接種して、各抗原に対する抗体価の測定を行うと共に、注射後の発熱と注射部位の剖検観察を行った。

#### 【0044】

#### 【表5】



		豚用処方		
		1	2	3
配合成分（重量％）	スクアララン	50.0	25.0	25.0
	スクワレン		25.0	25.0
	軽質流動パラフィン			
	dl- $\alpha$ -トコフェロール	0.02	0.02	0.02
	マンニトールオレエート（免疫賦活剤）	5.0	5.0	5.0
	ソルビタンモノラウレート	1.0		
	グリセリンモノステアレート			1.0
	ヘキサグリセリンモノラウレート	2.0		
	デカグリセリンモノラウレート	2.0		4.0
	POE(20)ソルビタンモノラウレート		1.0	
	POE(15)グリセリンモノオレエート		1.0	
	グルコース	5.0	5.0	5.0
	精製水	34.98	37.98	34.98
	合計	100.0	100.0	100.0
安定性		○	○	○

【0045】使用抗原：豚丹毒菌抽出抗原、アクチノバシラス・プルロニューモニエ1型、2型、及び5型培養上清由来抗原液。

【0046】（1）マウス毒性限度確認試験  
マウス腹腔内0.3mL注射後、3日目の体重を有意差検定（1% t 検定）した。なお1週間を通して、一般臨床観察を行った。

【0047】その結果を表6に示すが、豚用処方1及び

3の2群では、境界値以下のt値を示した。また臨床症状においても終始異常を認めず、良好な経過であった。一方、豚用処方2注射群においては、t値は境界値を越した。また注射後1日目及び2日目に全個体で目やにを認め、一部の個体ではふるえ、うずくまりが観察された。

【0048】

【表6】

		t値 ※1	臨床症状
供試ワクチン	豚用処方1	2.162	異常を認めず
	豚用処方2	3.4251	注射後1日目及び2日目に全個体で目やにを確認 一部の個体でふるえ、うずくまりを観察
	豚用処方3	1.447	異常を認めず

※1:t値境界値=2.8784

【0049】（2）モルモット力価試験  
体重約350gのモルモット10頭（免疫群8頭、対照群2頭）を用い、筋肉内に0.2mL、3週間隔2回注射後、2週目に採血した。得られた血清のアクチノバシラス・プルロニューモニエ1型、2型、及び5型に対するCF抗体価を測定した。

【0050】その結果を表7に示すが、豚用処方1及び3の2群では、1型、2型、及び5型のいずれに対するCF抗体価も上昇していた。一方、豚用処方2注射群においては、2型のCF抗体価の上昇が不十分であった。

【0051】

【表7】

		モルモット力価試験成績 ※2		
		1型	2型	5型
供試ワクチン	豚用処方1	197	166	256
	豚用処方2	108	68	166
	豚用処方3	108	108	156

※2:数値は免疫群8頭のGM値

【0052】(3)豚の安全試験  
約30日齢の豚を用い、筋肉内に1.0mL、1か月間隔で2回注射し、体温測定と臨床観察を行った。2回目注射後2か月目に剖検して、注射後60日目と90日目としての注射部位の注射痕の有無を肉眼的に観察した。

【0053】①注射後の体温の変化  
注射後の体温の変化を表8(第1回目注射)、9(第2

回目注射)に示すが、1回目注射時において豚用処方1及び2では発熱は殆ど認められず、臨床的な異常も何ら認められなかったが、乳化剤にポリオキシエチレン系界面活性剤を含む豚用処方2では個体によって42度に近い発熱が観察された。

【0054】

【表8】

注射後の体温の変化(豚、第1回目注射)									
供試ワクチン	豚用処方1			豚用処方2			豚用処方3		
個体No.	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
注射前	39.4	39.6	39.3	39.8	39.6	39.4	39.2	39.5	39.3
注射後6時間	40.6	40.4	40.3	41.8	41.8	41.8	39.4	39.8	40.2
注射後1日目	39.4	40.1	39.4	40	41.3	40.1	39.1	39.8	39.6

【0055】

【表9】

注射後の体温の変化(豚、第2回目注射)									
供試ワクチン	豚用処方1			豚用処方2			豚用処方3		
個体No.	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
注射前	39.8	39.6	39.6	39.8	39.5	39.2	39.4	39.3	39.1
注射後6時間	41.2	40.2	40.5	41.8	41.7	41.9	40	40.2	39.9
注射後1日目	39.7	39.8	39.6	40.2	40.9	40.2	39.8	39.8	39.5

【0056】②一般臨床症状  
豚用処方1及び2では注射後6時間でやや食欲、元気が減退する傾向を認めたが注射翌日では、全頭が元気と食欲を回復した。一方豚用処方2では注射後6時間後に於いて犬座姿勢をとり、食欲不振体のふるえ等の好ましくない症状が観察され、これらの症状は前後2回の注射において同様な傾向をみせた。

【0057】③注射痕の消長

豚用処方2の注射後90日目の部位で、筋間脂肪層におよそ3cm×3cmの範囲において、淡黄褐色の大豆大硬結病変を認めた。表10に結果をまとめた。

【0058】

【表10】

		注射痕の消長	
		注射後60日	注射後90日
供試ワクチン	豚用処方1	注射痕を認めず。	注射痕を認めず。
	豚用処方2	出血痕を認める。	筋間脂肪層におよそ3cm×3cmの範囲において、淡黄褐色の大豆大硬結病変
	豚用処方3	注射痕を認めず。	注射痕を認めず。

#### 【0059】(4) まとめ

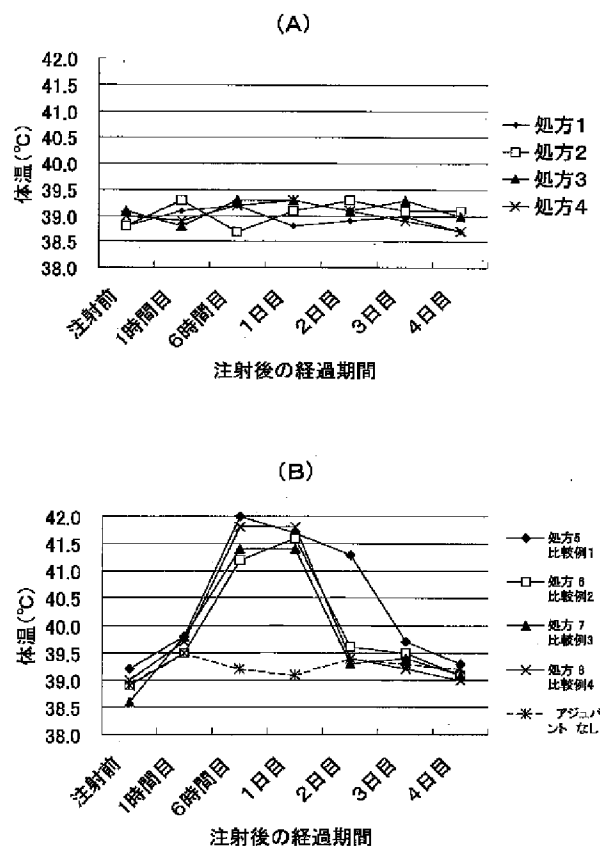
以上の結果より、スクワランをベースオイルとし、親水性乳化剤としてポリオキシエチレン系を含まず、さらに乳化安定剤としてグルコースを含有するO/W型オイルアジュバントである豚用処方1が高い力価を試験動物に保有させる一方、安全性をも有するO/W型オイルアジ

ュバントであることが明らかとなった。この豚用処方1は、請求項1を満たすO/W型オイルアジュバントである。猫や鶏での場合と同様に、豚においても十分なワクチン効果と安全性を付加することが証明された。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2における猫の発熱状況を示すグラフ。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成12年7月13日（2000. 7. 13）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項1】 油相成分が動物油及び／又は植物油であり、乳化剤として分子中にポリオキシアルキレン構造を持たない多価アルコール脂肪酸エステルを、免疫増強剤として糖又は糖アルコールの脂肪酸エステルを含有し、分子中にポリオキシアルキレン構造を持つ乳化剤を含有しない水中油型エマルジョンからなる動物用ワクチンのオイルアジュバント。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、水中油型（以下O/W型という）のオイルアジュバント及びそれらのアジュバントを含む動物用のワクチンに関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来、

免疫を強化するためのオイルアジュバントとして、フロイントアジュバントに代表される油中水型（以下W/O型という）アジュバントや、親水性界面活性剤を多く用いたO/W型アジュバントが主として使用されてきた。しかしこれらの内、W/O型オイルアジュバント製剤は免疫効果が高い反面、ワクチン注射部位に硬結や腫脹、疼痛、壊死などを引き起こす事例が少なからずあった。一方、O/W型オイルアジュバント製剤では接種部位の硬結、腫脹、壊死などを引き起こす例は少ないものの、乳化剤として、可溶化力が強く細胞障害性が高いポリオキシエチレン系の親水性乳化剤を含むことから、ワクチンを接種された動物に強い発熱が認められることが問題となっていた。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、本発明は、油相成分が動物油及び／又は植物油（以下動・植物油という）であり、乳化剤として分子中にポリオキシアルキレン構造を持たない多価アルコール脂肪酸エステルを、免疫増強剤として糖又は糖アルコールの脂肪酸エステルを含有し、分子中にポリオキシアルキレン構造を持つ乳化剤を含有しない水中油型エマルジョンからなる動物用ワクチンのオイルアジュバントを提供するものである。更に本発明は、該オイルアジュバントと、少なくとも一種の抗原とを含む、動物用ワクチンを提供するものである。

フロントページの続き

(72)発明者 橋本 悟  
東京都板橋区蓮根3-24-3 日本サーフ  
ァクタント工業株式会社内  
(72)発明者 扇谷 年昭  
京都府京都市伏見区桃山町大島38-251

(72)発明者 片山 茂二  
京都府宇治市池森44-11  
(72)発明者 小田 健司  
京都府城陽市寺田市の久保2-7  
Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 FF11 FF14